

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 08157497

PUBLICATION DATE : 18-06-96

APPLICATION DATE : 07-12-94

APPLICATION NUMBER : 06304093

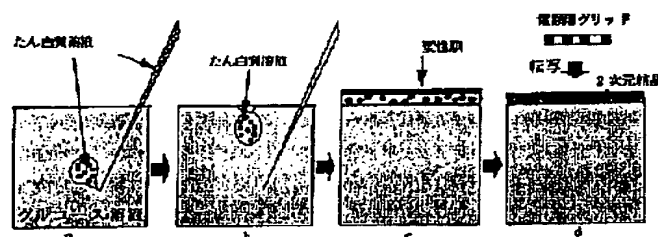
BEST AVAILABLE COPY

APPLICANT : RES DEV CORP OF JAPAN;

INVENTOR : NAGAYAMA KUNIAKI;

INT.CL. : C07K 14/47 C07K 1/107

TITLE : CONTROL STRUCTURE HAVING
PROTEIN CRYSTALLINE FORM



ABSTRACT : PURPOSE: To obtain the subject control structure for biological elements, etc., by modifying a protein for forming a salt bridge by a metal ion or an amino acid situated at salt bridge position of a protein having a metal ion core and artificially reconstructing a protein crystalline form.

CONSTITUTION: This control structure of a protein crystalline form is obtained by modifying a protein (e.g. apoferritin) or an amino acid located at a salt bridge site of a protein having a metal ion core with an amino acid not having electron charge, e.g. serine, threonine or alanine. and realize novel crystalline protein structure artificially reconstructed and is useful as a functional structure of biological element, biological sensor, biocompatible material, etc. The control structure is obtained by injecting a protein solution into 2% glucose solution by a microsyringe, developing the protein solution onto the surface by the difference of specific gravity, forming two dimensional crystals of the protein by CdSO_4 and Nail in glucose solution and transferring the crystals to a supporting film.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-157497

(43) 公開日 平成8年(1996)6月18日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47		8318-4H		
1/107		8318-4H		

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-304093

(22) 出願日 平成6年(1994)12月7日

特許法第30条第1項適用申請有り 1994年10月8日~10月10日 日本化学会主催の「第47回コロイドおよび界面科討論会」において文書をもって発表

(71) 出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 武田 茂樹

長野県長野市稲田498-1

(72) 発明者 吉村 英恭

茨城県つくば市松代3-25-1-501

(72) 発明者 永山 国昭

東京都杉並区阿佐谷北2-21-15

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 蛋白質結晶形の制御構造

(57) 【要約】

【目的】 蛋白質の結晶形を制御する。

【構成】 金属イオンによる塩橋を形成する蛋白質または金属イオンコアを持つ蛋白質の塩橋部位のアミノ酸を改変する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 金属イオンによる塩橋を形成する蛋白質、もしくは金属イオンコアを持つ蛋白質の塩橋部位ないしは金属イオンコア形成部位にあるアミノ酸が改変されていることを特徴とする蛋白質結晶形の制御構造。

【請求項 2】 電荷を持たないアミノ酸によって改変されている請求項 2 の構造。

【請求項 3】 蛋白質がアポフェリチン類である請求項 1 または 2 の構造。

【請求項 4】 セリン、トレオニン、グリシン、アラニン等の電荷を持たないアミノ酸により改変されている請求項 3 の構造。

【請求項 5】 蛋白質がフェリチンである請求項 1 または 2 の構造。

【請求項 6】 2 次元結晶形または 3 次元結晶形からなる請求項 1 ないし 5 のいずれかの構造。

【請求項 7】 2 次元結晶は、液面上への蛋白質溶液の展開により得られている請求項 6 の構造。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、蛋白質結晶形の制御構造に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、生物素子、バイオセンサー、生体適合材料等の機能構造として有用な、結晶形が制御された蛋白質結晶構造に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】 従来より、蛋白質のある種のものの 3 次元結晶系は、溶液条件、結晶化条件に沿って変化することが知られている。また、ある種の蛋白質は、そのアミノ酸配列のある部位を別種のものに改変することで結晶を形成することが知られている。

【0003】 しかしながら、これまでの技術では、これらの蛋白質の結晶形を人為的に所要のものに制御するための手段は確立されていないのが実情である。このことは、次世代の分子素子等への蛋白質工学の発展にとって大きな障害になっていいる。たとえば、ヒト肝臓 H-アポフェリチンの 86 番目のアミノ酸（リジン）をグルタミンに改変することにより、従来は結晶が得られなかった蛋白質について結晶が得られたことが報告されている（Lawson, D. M., Artymniuk, P. J., Yeudall, S. J., Smith, J. M., Livingstone, J. C., Treffry, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Tomas, C. D., Shaw, W. H., Harrison, P. M. Nature, 248, 541-544 (1991)）が、このアミノ酸改変が普通的手段として結晶形制御に適用できるとの思想は教示されていないし、その根拠も明示されていない。

【0004】 そこで、この発明は、以上の通りの従来技術の限界を超えて、蛋白質の結晶形を制御することの手段を確立し、この制御された構造を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】 この発明は、上記の課題を解決するものとして、金属イオンによる塩橋を形成する蛋白質、もしくは金属イオンコアを持つ蛋白質の塩橋部位ないしは金属イオンコア形成部位にあるアミノ酸が改変されていることを特徴とする蛋白質結晶形の制御構造を提供する。

【0006】 そしてこの発明は、上記構造において、電荷を持たないアミノ酸によって改変されていることをその態様としてもいいる。

【0007】

【作用】 この発明においては、上記の通り、塩橋が形成される部位、あるいは金属イオンコアの形成部位にあるアミノ酸を改変することにより、その結晶形を制御することを可能としている。これにより、従来より知られているいわゆる野生型の蛋白質とは異なる各種の結晶形の蛋白質結晶が得られる。このような制御構造は、蛋白質工学における 2 次元配列結晶、あるいは 3 次元結晶の作製にとって極めて有用なものとなる。アミノ酸の改変そのものは、従来公知の蛋白質工学（遺伝子工学）手法によって可能であり、対象とする蛋白質についても、前記の通り、金属イオンを介して塩橋を形成するもの、あるいは金属イオンによってコア形成するもののうちから適宜に選択されることになる。

【0008】 実際に結晶形を形成する場合には、たとえば水銀やグルコース溶液の液面上に蛋白質の水、あるいは有機溶媒溶液を展開して、水あるいは溶媒を蒸発、吸引等により除去することで 2 次元結晶形が形成可能であり、3 次元結晶については、金属イオンを使用することなく、蛋白質濃度を増大することで可能となる。これらの結晶は、固体 2 次元基板上への転写付着、あるいは結晶そのものの液面上からの単離によって、その利用目的に沿った態様に転換することができる。

【0009】 たとえばこの発明が対象とする蛋白質としてはアポフェリチンや鉄、マンガン、ニッケル、コバルト等の遷移金属などのコアを持ったフェリチン等がその代表例として示される。改変するためのアミノ酸としては、たとえばセリン、トレオニン、グリシン、アラニン等の電荷を持たないものがその代表例として示される。

【0010】 以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明について説明する。

【0011】

【実施例】 蛋白質は馬肝臓よりクローニングした L 鎖のみからなるアポフェリチン（ $M_w = 444,000$ ）を大腸菌により発現させた組み換え体を使用した。アポフェリチンはカドミウムイオンの塩橋により 3 次元結晶（面心立方格子 $F432$ ）を作ることが知られている。このアポフェリチンのカドミウムイオン結合部位にあたるアスパラギン酸（84）およびグルタミン（86）を電荷のないセリンにした改変体と野生型の結晶性を比

較した。

【0012】2次元の結晶化には、図1に示した手順を採用した。すなわち、次の通りとした。

a. 直径15mmの円形テフロントラフに2%グルコース溶液を0.5ml満たす。マイクロシリンジの注射針をグルコース展開層の中に入れ、たん白質溶液(1-5 μ l)を注入する。

【0013】b. たん白質溶液は比重の差により表面上昇し、表面に達するとすみやかに界面に展開する。この方法をとることで均一で再現性のよい展開ができるようになった。たん白質濃度は0.3-5mg/mlである。

c. 展開された、たん白質の一部は表面で変性して薄い(約1nm)均一な膜を形成する。変性していないたん白質はこの膜に吸着していく。

【0014】d. グルコース溶液中に10mM CdSO₄・0.15M NaClをいれておく。アポフェリチンは大きな二次元結晶をつくる。この二次元結晶は変性膜と共に、カーボン支持膜または多孔カーボン膜を張った電顕用グリッドに水平付着法で転写する。とくに多孔カーボン膜に転写したものは質のよい2次元結晶が得られた。

【0015】野生型アポフェリチンの場合、グルコース溶液にカドミニウム(10mM)を加えることで大きな(1 μ m²以上)2次元結晶(6方格子)の成長が観察された。画像解析の結果、アポフェリチンは3回対称軸を結晶面に垂直に向けた、面心立方格子F432の(1, 1, 1)面と同じ分子配向をしていることが画像解析の結果わかった(図2A(a=b=13nm, γ =120°))。カドミニウム結合部位を持たない改変体では、カドミニウムの有無にかかわらず2次元結晶、3次元結晶を形成した。2次元結晶はa=b=13nm, γ =90°の正方格子、a=b=13nm, γ =100°(図2B)およびa=13, b=15nm, γ =12

0°(図2C)の斜方格子、a=b=13nm, γ =120°(図2D)の六方格子などの結晶系が見られた。野生型とは異なり、どの結晶系も2回対称軸を垂直にしていると考えられる。なお、図2A, B, C, D左側は負染色した電顕像、中央はそのフーリエ変換像、右側はフーリエ変換による再構成像である。また図3a, b, cにはX線構造解析より得られた構造因子を使って計算した投影像を示した。aは、(1, 1, 1)面の投影像(2.0nm分解能)、bは、(1, 1, 0)面の投影像(2.0nm分解能)およびcは、(1, 1, 0)面の投影像(2.4nm分解能)を示している。カドミニウム結合部位を持たない改変体は結晶をつくらないと予想していたが、生成した改変体はカドミニウム塩橋による強い相互作用がなくなった結果、他の部位による蛋白質間相互作用が顕著になって多彩な結晶系ができたものと考えられる。野生型でカドミニウムが存在しない場合に結晶しないのは、その結合部位の電荷による斥力のためと考えられる。

【0016】このように、この発明によって、これまでに実現されていない蛋白質結晶構造の制御が可能となる。

【0017】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明により、従来になく人為的に再構成される結晶形蛋白質構造が実現され、分子素子等の次世代の蛋白質工学の技術発展に大きく寄与し、かつ、機能材料としての応用を可能とする。

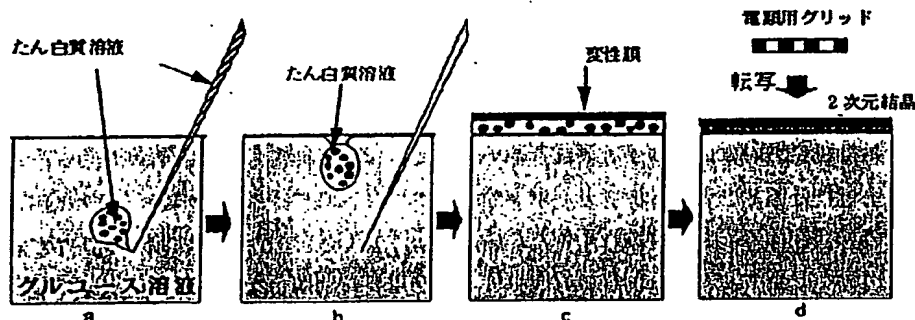
【図面の簡単な説明】

【図1】2次元結晶の形成方法を例示した工程図である。

【図2】実施例としての2次元結晶の電子顕微鏡像を示した図面に代わる写真である。

【図3】実施例としてのX線解析像について示した図面に代わる写真である。

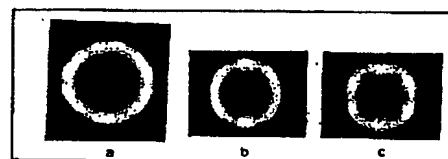
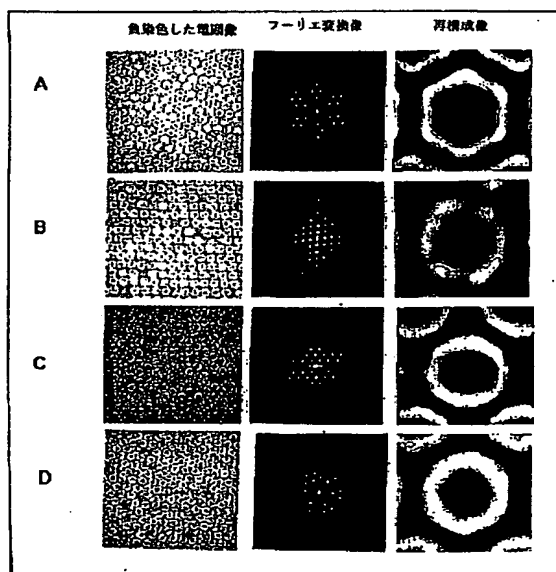
【図1】



BEST AVAILABLE COPY

【図2】

【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成7年5月10日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】蛋白質結晶形の制御構造

【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属イオンによる塩橋を形成する蛋白質、もしくは金属イオンコアを持つ蛋白質の塩橋部位にあるアミノ酸が改変されていることを特徴とする蛋白質結晶形の制御構造。

【請求項2】 電荷を持たないアミノ酸によって改変されている請求項2の構造。

【請求項3】 蛋白質がアポフェリチン類である請求項1または2の構造。

【請求項4】 セリン、トレオニン、グリシン、アラニン等の電荷を持たないアミノ酸により改変されている請求項3の構造。

【請求項5】 蛋白質がフェリチンである請求項1または2の構造。

【請求項6】 2次元結晶形または3次元結晶形からなる請求項1ないし5のいずれかの構造。

【請求項7】 2次元結晶は、液面上への蛋白質溶液の展開により得られている請求項6の構造。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、蛋白質結晶形の制御構造に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、生物素子、バイオセンサー、生体適合材料等の機能構造として有用な、結晶形が制御された蛋白質結晶構造に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】従来より、蛋白質のある種のものの3次元結晶系は、溶液条件、結晶化条件に沿って変化することが知られている。また、ある種の蛋白質は、そのアミノ酸配列のある部位を別種のものに改変することで結晶を形成することが知られている。

【0003】しかしながら、これまでの技術では、これらの蛋白質の結晶形を人為的に所要のものに制御するための手段は確立されていないのが実情である。このことは、次世代の分子素子等への蛋白質工学の発展にとって大きな障害になってもいる。たとえば、ヒト肝臓H-アポフェリチンの86番目のアミノ酸（リジン）をグルタミンに改変することにより、従来は結晶が得られなかった蛋白質について結晶が得られたことが報告されている（Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Yeudall, S. J., Smith, J. M., Livingstone, J. C., Treffry, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Tomas, C. D., Shaw, W. H., Harrison, P. M. Nature, 248, 541-544 (1991)）が、このアミノ酸改変が普通的手段として結晶形制御に適用できるとの思想は教示されていないし、その根拠も明示されていない。

【0004】そこで、この発明は、以上の通りの従来技術の限界を超えて、蛋白質の結晶形を制御することの手段を確立し、この制御された構造を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、金属イオンによる塩橋を形成する蛋白質、もしくは金属イオンコアを持つ蛋白質の塩橋部位にあるアミノ酸が改変されていることを特徴とする蛋白質結晶形の制御構造を提供する。

【0006】そしてこの発明は、上記構造において、電荷を持たないアミノ酸によって改変されていることをその態様としてもいる。

【0007】

【作用】この発明においては、上記の通り、塩橋が形成される部位にあるアミノ酸を改変することにより、その結晶形を制御することを可能としている。これにより、従来より知られているいわゆる野生型の蛋白質とは異なる各種の結晶形の蛋白質結晶が得られる。このような制御構造は、蛋白質工学における2次元配列結晶、あるいは3次元結晶の作製にとって極めて有用なものとなる。アミノ酸の改変そのものは、従来公知の蛋白質工学（遺伝子工学）手法によって可能であり、対象とする蛋白質についても、前記の通り、金属イオンを介して塩橋を形成するもののうちから適宜に選択されることになる。

【0008】実際に結晶形を形成する場合には、たとえば水銀やグルコース溶液の液面上に蛋白質の水、あるいは有機溶媒溶液を展開して、水あるいは溶媒を蒸発、吸引等により除去することで2次元結晶形が形成可能であり、3次元結晶については、金属イオンを使用することなく、蛋白質濃度を増大することで可能となる。これらの結晶は、固体2次元基板上への転写付着、あるいは結晶そのものの液面上からの単離によって、その利用目的に沿った態様に転換することができる。

【0009】たとえばこの発明が対象とする蛋白質としてはアポフェリチンや鉄、マンガン、ニッケル、コバルト等の遷移金属などのコアを持ったフェリチン等がその代表例として示される。改変するためのアミノ酸としては、たとえばセリン、トレオニン、グリシン、アラニン等の電荷を持たないものがその代表例として示される。

【0010】以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明について説明する。

【0011】

【実施例】蛋白質は馬肝臓よりクローニングしたL鎖のみからなるアポフェリチン（ $M_w=444,000$ ）を大腸菌により発現させた組み換え体を使用した。アポフェリチンはカドミウムイオンの塩橋により3次元結晶（面心立方格子F432）を作ることが知られている。このアポフェリチンのカドミウムイオン結合部位にあたるアスパラギン酸（84）およびグルタミン（86）

を電荷のないセリンにした改変体と野生型の結晶性を比較した。

【0012】2次元の結晶化には、図1に示した手順を採用した。すなわち、次の通りとした。

a. 直径15mmの円形テフロントラフに2%グルコース溶液を0.5ml満たす。マイクロシリンジの注射針をグルコース展開層の中に入れ、たん白質溶液（1-5 μ l）を注入する。

【0013】b. たん白質溶液は比重の差により表面上上昇し、表面に達するとすみやかに界面に展開する。この方法をとることで均一で再現性のよい展開ができるようになった。たん白質濃度は0.3-5mg/mlである。

c. 展開された、たん白質の一部は表面で変性して薄い（約1nm）均一な膜を形成する。変性していないたん白質はこの膜に吸着していく。

【0014】d. グルコース溶液中に10mM CdSO₄と0.15M NaClをいれておく。アポフェリチンは大きな2次元結晶をつくる。この2次元結晶は変性膜と共に、カーボン支持膜または多孔カーボン膜を張った電顕用グリッドに水平付着法で転写する。とくに多孔カーボン膜に転写したものは質のよい2次元結晶が得られた。

【0015】野生型アポフェリチンの場合、グルコース溶液にカドミウム（10mM）を加えることで大きな（1 μ m²以上）2次元結晶（6方格子）の成長が観察された。画像解析の結果、アポフェリチンは3回対称軸を結晶面に垂直に向けた、面心立方格子F432の

（1, 1, 1）面と同じ分子配向をしていることが画像解析の結果わかった（図2A（ $a=b=13$ nm, $\gamma=120^\circ$ ））。カドミウム結合部位を持たない改変体では、カドミウムの有無にかかわらず2次元結晶、3次元結晶を形成した。2次元結晶は $a=b=13$ nm, $\gamma=90^\circ$ の正方格子、 $a=b=13$ nm, $\gamma=100^\circ$ （図2B）および $a=13$, $b=15$ nm, $\gamma=120^\circ$ （図2C）の斜方格子、 $a=b=13$ nm, $\gamma=120^\circ$ （図2D）の六方格子などの結晶系が見られた。野生型とは異なり、どの結晶系も2回対称軸を垂直にしていると考えられる。なお、図2A, B, C, D左側は負染色した電顕像、中央はそのフーリエ変換像、右側はフーリエ変換による再構成像である。また図3a, b, cにはX線構造解析より得られた構造因子を使って計算した投影像を示した。aは、（1, 1, 1）面の投影像（2.0nm分解能）、bは、（1, 1, 0）面の投影像（2.0nm分解能）およびcは、（1, 1, 0）面の投影像（2.4nm分解能）を示している。カドミウム結合部位を持たない改変体は結晶をつくらないと予想していたが、生成した改変体はカドミウム塩橋による強い相互作用がなくなった結果、他の部位による蛋白質間相互作用が顕著になって多彩な結晶系ができたもの

と考えられる。野生型でカドミニウムが存在しない場合に結晶しないのは、その結合部位の電荷による斥力のためと考えられる。

【0016】このように、この発明によって、これまでに実現されていない蛋白質結晶構造の制御が可能となる。

【0017】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明により、従来にない人為的に再構成される結晶形蛋白質構造が実現され、分子素子等の次世代の蛋白質工学の技術発

展に大きく寄与し、かつ、機能材料としての応用を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【図1】2次元結晶の形成方法を例示した工程図である。

【図2】実施例としての2次元結晶の電子顕微鏡像を示した図面に代わる写真である。

【図3】実施例としてのX線解析像について示した図面に代わる写真である。